doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.08.17
J South Med Univ, 2015, 35(8): 1170-1174

基础研究

Wnt7a-Akt/mTOR信号通路在肾衰营养胶囊改善慢性肾衰竭大鼠骨骼肌萎缩中的作用

王 明[1],汪东涛[2],尹 懿[2],鲁 路[2],石 莹[1],黄燕峰[2],陈德秀[2],魏连波[1,2]
南方医科大学[1]珠江医院中西医结合肾病中心,广东 广州 510282;[2]中医药学院,广东 广州 510515

摘要:目的 探讨Wnt7a-Akt/mTOR信号通路在肾衰营养胶囊改善慢性肾衰竭(CRF)大鼠骨骼肌萎缩中的作用及机制。**方法** 采用切除5/6肾的方法制作CRF模型,予4%酪蛋白饲料喂养制作CRF营养不良大鼠模型。将大鼠随机分为正常组、模型组、中药组和开同组。采用组织病理学检测TA横截面积并计算肌纤维面积分布;采用同位素^{14}C-苯丙氨酸掺入法检测肌肉蛋白合成;采用Western blot检测Wnt7a-Akt/mTOR信号通路中的蛋白表达。**结果** 肾衰营养胶囊增加了CRF大鼠体质量和骨骼肌质量的作用,形态学表现为TA横截面积增加,促进蛋白质合成增加以及骨骼肌组织Wnt7a-Akt/mTOR信号通路中蛋白表达上调。**结论** 肾衰营养胶囊具有改善CRF模型大鼠骨骼肌萎缩的作用,其机制可能上调骨骼肌Wnt7a-Akt/mTOR信号通路和促进骨骼肌蛋白质合成相关。
关键词:慢性肾衰竭;营养不良;骨骼肌萎缩;Wnt7a;肾衰营养胶囊

Shenshuai Yingyang capsule ameliorates muscle atrophy in rats with chronic renal failure: role of Wnt7a-Akt/mTOR signal pathway

WANG Ming[1], WANG Dongtao[2], YIN Yi[2], LU Lu[2], SHI Ying[1], HUANG Yanfeng[2], CHEN Dexiu[2], WEI Lianbo[1,2]
Nephropathy Center of TCM-Integrated Medicine, [1]Zhujiang Hospital, Guangzhou 510282, China; [2]School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the effect of Shenshuai Yingyang Capsule (SSYYJN) in ameliorating muscle atrophy in rats with chronic renal failure (CRF) and explore the role of Wnt7a-Akt/mTOR signal pathway in mediating this effect. **Methods** Male rats were randomly assigned to 5/6 nephrectomy group and sham-operated group, and the former group was further randomly divided into CRF model group, KA group, and SSYYJN group. The size of anterior tibia muscle was examined microscopically with HE staining. Protein synthesis in the soleus muscle was investigated by ^{14}C-phenylalanine experiment, and the expression of Wnt7a, frizzled-7, phospho-Akt, phospho-mTOR and GAPDH were detected with Western blotting. **Results** The body weight, the wet and dry weight, cross-sectional area, and muscle protein synthesis of the anterior tibia muscles, and expressions of the proteins in the Wnt7a/Akt signaling pathway all increased significantly in SSYYJN and KA groups as compared with those in the model group. **Conclusion** SSYYJN can effectively improve muscle atrophy in the rat model of CRF possibly by reversing the reduction in the expressions of Wnt7a/Akt signaling pathway proteins in the skeletal muscles.
Key words: chronic renal failure; malnutrition; muscle atrophy; Wnt7a; Shenshuai Yingyang Capsule

慢性肾脏病(CKD)患者进展至慢性肾功能衰竭(CRF)期常伴随蛋白-能量消耗(PEW),表现为机体蛋白质合成减少、分解增加[1-2]。骨骼肌萎缩是PEW重要临床表现[3-4]。目前已证实PEW状态显著增加CRF患者心血管事件发生率,并与死亡事件密切相关[5-6]。肾衰营养胶囊是魏连波教授经验方,具有健脾补肾、益气养血、通腑泻浊功效,临床上用于预防和治疗CRF相关PEW、改善CRF导致的骨骼肌萎缩具有较好的临床效果,但其机制尚不明确。近年研究发现Wnt7a-Akt/mTOR信号通路能够调节骨骼肌的发育及蛋白质代谢,是CRF患者PEW状态的潜在干预靶点[7-9]。本课题拟通过检测CRF-PEW模型大鼠胫骨前肌(TA)组织病理及Wnt7a-Akt/mTOR信号,观察肾衰营养胶囊对CRF-PEW状态下骨骼肌的影响,并探讨其预防和治疗CRF相关PEW的可能机制。

收稿日期:2015-03-13
基金项目:国家自然科学基金(81173457,81373808,81403215)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81173457, 81373808, 81403215).
作者简介:王 明,医学博士,主治医师,E-mail: wming1999@163.com;汪东涛,医学博士,E-mail: 95401864@qq.com。王 明,汪东涛共同为第一作者
通信作者:魏连波,教授,主任医师,博士生导师,E-mail: weilianbo@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠40只,体质量200~250 g,SPF级,由南方医科大学实验动物中心提供(实验动物中心许可证号:SCXK 2006-0015),合格证号:NO.0048741。

1.1.2 受试药品 肾衰营养胶囊由党参、白术、茯苓、甘草、黄芪、当归、杜仲、大黄、春砂仁组成(广东省药材公司提供),经本校中药制剂室鉴定,由本校中药新药实验室按处方比例提取制成胶囊,每克成药含生药5.67 g,成人用量每日成药15 g,换算成大鼠用量8 g/(kg·d)。开同(北京费森尤斯卡比医药有限公司,批号:U1430)规格0.63 g/片,成人用量7.56~15.12 g/d,换算成大鼠用量1 g/(kg·d)。酪蛋白(广东捷倍斯生物科技公司提供,批号分别为200903225),按4%酪蛋白比例配成饲料。

1.1.3 试剂 anti-Wnt7a mouse monoclonal(批号06/2013, Santa Cruz)、Frizzled-7(批号06/2013, Santa Cruz)、anti-phospho-Akt(Ser473) rabbit monoclonal(批号09/2013,美国Cell Signaling Technology),phospho-mTOR(批号09/2013,美国Cell Signaling Technology)、GAPDH(批号06/2013,Santa Cruz)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模、分组和标本采集 大鼠适应性饲养1周后随机分为手术组(n=30)和假手术组(n=10)。手术组行5/6肾切除术,具体为左肾2/3切除术,切除左肾上下极各1/3的组织;右肾全切术,摘除右肾。假手术组大鼠同期进行两次手术,仅剥离肾包膜,不做肾切除。

术后1周手术组随机分为模型对照组(Model, n=10),肾衰营养胶囊组(SSYYJN, n=10)和开同组(KA, n=10),假手术组作为正常对照组(Control, n=10)。分别给予Model组、SSYYJN组和KA组低蛋白饮食(4%酪蛋白),假手术组给予正常蛋白饮食。各组大鼠均自由饮水。

1.2.2 骨骼肌组织制备 药物干预16周后处死大鼠。腹主动脉采血后,迅速取双侧完整TA称重后浸入固定液(4% PA液),于4 ℃后固定6~8 h。固定处理后做冰冻组织,移入30%蔗糖溶液(0.1 mol/L PB配制,pH7.2~7.4)中,于4 ℃保存,待标本沉底即可进行切片。经后固定做石蜡切片的组织标本,以流水冲洗24 h,充分去除残存的固定剂,之后将组织进行修块(肌组织修切成长方体,其长轴与肌纤维的纵轴一致),剔除明显的脂肪和结缔组织。部分新鲜组织,立即行蛋白质合成和分解代谢检测;部分骨骼肌组织液氮冷冻后,置−80 ℃冰箱保存待检。

1.2.3 TA肌纤维横截面积测定 TA标本横切面经HE染色后,用Leica Qwin图像分析系统测量肌纤维的横截面积。每个标本取4个切面,每个切面随机选取4个高倍镜视野,用Leica Dc 300彩色数码相机采图,所得图像用Leica Qwin分析软件分析。测量每标本各视野肌纤维的面积,所有测量值的均数作为该标本的横截面积。

1.2.4 TA蛋白合成代谢检测 将TA置于DMEM(5 mL)中37 ℃充氧孵育30 min,然后在含放射性同位素^{14}C-苯丙氨酸的DMEM中继续孵育1 h。PBS洗3次,肌肉进行匀浆,加入10% TCA沉淀蛋白质,吸弃上清,加入0.5 N NaOH溶解沉淀的蛋白,取90%加入闪烁液进行液闪计数,取10%测蛋白质浓度,检测单位时间内掺入的^{14}C-苯丙氨酸的放射性含量,分析蛋白合成率。

1.2.5 Western blot检测TA中Wnt7a、Frizzled-7、phospho-Akt、phospho-mTOR、GAPDH水平 处理后提取TA总蛋白,每个标本取80 μg蛋白质,BCA法检测蛋白含量,每个孔上样量为30 μg,加上样缓冲液,PCR仪99.9 ℃变性5 min,4 ℃备用。制备12%分离胶和5%浓缩胶,上样电泳,进行SDS-PAGE分离,电泳结束后将蛋白质转移到PVDF膜上,100 mA转膜1 h,5%脱脂奶粉封闭1 h,TBST、TBS洗膜后一抗Wnt7a(1∶200稀释)、Frizzled-7(1∶200稀释)、phospho- Akt(1∶1000稀释)、phospho-mTOR(1∶1000稀释)、GAPDH(1∶200稀释)4 ℃过夜。次日TBST、TBS洗膜后二抗室温孵育1 h,经过ECL化学发光,采集图像光密度,获得图像用Image Tool 3.0测定并分析条带吸光度(IA),以GAPDH为内参。

1.3 统计学处理

计量资料数据均以均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,方差齐采用LSD法,方差不齐采用Dunnetts'S T_3法;两样本均数间比较用t检验,用SPSS 11.5统计软件进行统计学处理。P<0.05认为存在统计学差异。

2 结果

2.1 肾衰营养胶囊对大鼠TA湿重、干重及干重体质量比的影响

经统计学分析,与Control组相比,Model组动物TA的湿重、干重皆不同程度的降低(P<0.01),SSYYJN和KA组干预后使TA的湿重、干重显著增加(P<0.01),但SSYYJN组与KA组之间比较无统计学差异(P>0.05);与Control组相比,Model组动物TA干重体质量比降低(P<0.01),而与Model组相比,SSYYJN组和KA组大鼠TA干重体质量比明显增加(P<0.01),SSYYJN组增加的更加显著。上述结果提示肾衰营养胶囊能增加CRF大鼠TA湿重、干重及干重体质量比,效果优于开同,因而对CRF肌萎缩有较好的防治作用(表1)。

2.2 肾衰营养胶囊对大鼠TA横截面积的影响

TA标本经HE染色后,用图像分析系统测量肌纤维的横截面积,结果如下:与Control组相比,Model组动物TA的横截面积减小(P<0.01);相比Model组,SSYYJN组和KA组TA的横截面积显著增加(P<0.01)。上述结果提示肾衰营养胶囊能增加TA横截面积,具有改善CRF肌萎缩的作用(图1、2)。

表1 各组大鼠TA湿质量、干质量及干质量体质量比变化

Tab.1 Wet weight, dry weight, and dry/body weight ratio of the anterior tibia muscle in different groups (*Mean±SD*)

Group	*n*	Natural Weight(mg)	Dry Weight(mg)	Natural/Dry Weight(mg/g)
Control	10	1000.3±54.0	269.4±12.7	0.45±0.02
Model	8	586.5±58.7**	164.0±8.7**	0.35±0.01**
SSYYJN	9	806.1±53.6**##	215.1±17.9**##	0.42±0.03**##△△
KA	9	759.4±39.9**##	217.1±11.7**##	0.38±0.03**#
F		98.864	94.197	28.631
P		<0.001	<0.001	<0.001

$^{**}P<0.01$ *vs* Control group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ *vs* Model group; $^{\triangle\triangle}P<0.01$ *vs* KA group.

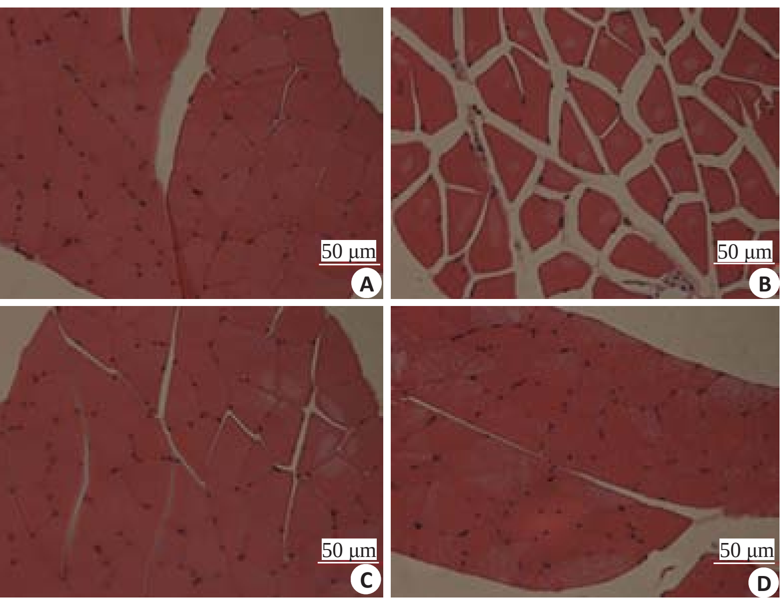


图1 HE染色法观察各组骨骼肌肌纤维面积

Fig.1 Cross-sectional area of the muscles measured microscopically with HE staining in different groups (Original magnification: ×200). *A*: Control; *B*: Model; *C*: SSYYJN; *D*: KA.

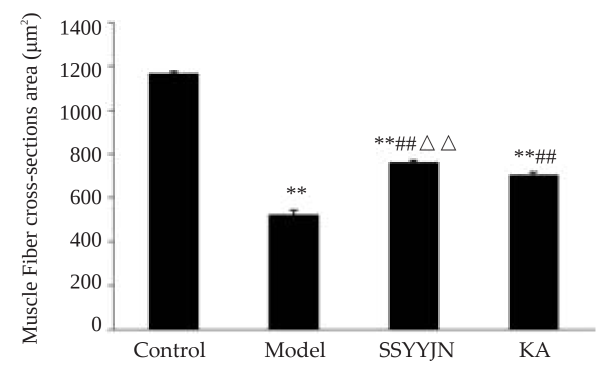


图2 统计各组骨骼肌肌纤维面积

Fig.2 Cross-sectional area of muscles in different groups. $^{**}P<0.01$ *vs* Control group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* Model group; $^{\triangle\triangle}P<0.01$ *vs* KA group.

2.3 肾衰营养胶囊对大鼠TA蛋白合成代谢的影响

经统计学分析，与Control组相比，Model组动物蛋白质合成代谢降低(*P*<0.01)；相对Model组，SSYYJN组和KA组蛋白质合成代谢明显上升(*P*<0.01)，且KA组蛋白质合成代谢更显著(*P*<0.01)。上述结果提示在CRF状态下，骨骼肌蛋白质合成代谢降低，肾衰营养胶囊能增加肌肉蛋白合成率，因而对CRF肌萎缩有一定的治疗作用(图3)。

2.4 肾衰营养胶囊对大鼠TA中Wnt7a蛋白表达的影响

经统计学分析，与Control组相比，Model组TA的Wnt7a蛋白的表达下降(*P*<0.01)，相对Model组，SSYYJN组和KA组TA组织Wnt7a蛋白的表达均不同程度的增加(*P*<0.01)，SSYYJN组增加的更加显著，与KA组比较有统计学差异(*P*<0.05)。上述结果提示肾衰营养胶囊能增加TA的Wnt7a蛋白的表达，其改善CRF骨骼肌萎缩的作用可能与上调骨骼肌Wnt7a蛋白的表达有关(图4)。

2.5 肾衰营养胶囊对大鼠TA Frizzled-7蛋白表达的影响

经统计学分析，与Control组相比，Model组动物TA的Frizzled-7蛋白的表达下降(*P*<0.01)，相对Model组，SSYYJN组和KA组TA的Frizzled-7蛋白的表达均不同程度的增加(*P*<0.01或*P*<0.05)，但SSYYJN组与KA组之间差异无统计学意义(*P*>0.05)。上述结果提示肾衰营养胶囊能增加TA的Frizzled-7蛋白的表达，其改善CRF骨骼肌萎缩的作用可能与上调骨骼肌Frizzled-7蛋白的表达有关(图5)。

2.6 肾衰营养胶囊对大鼠TA中p-Akt蛋白表达的影响

经统计学分析，与Control组相比，Model组TA骨骼肌p-Akt蛋白的表达下降(*P*<0.01)，相对Model组，SSYYJN组和KA组骨骼肌p-Akt蛋白的表达均不同程度的增加(*P*<0.01或*P*<0.05)，KA组增加的更加显著，与相比SSYYJN组比较有统计学差异(*P*<0.05)。上述结果提示肾衰营养胶囊能增加TA p-Akt蛋白的表达，其改善CRF骨骼肌萎缩的作用可能与上调骨骼肌p-Akt蛋白的表达有关(图6)。

2.7 肾衰营养胶囊对大鼠TA p-mTOR蛋白表达的影响

经统计学分析，与Control组相比，Model组TA p-mTOR蛋白的表达增加(*P*<0.01)，相对Model组，SSYYJN组和KA组TA p-mTOR蛋白的表达均不同程度的增加(*P*<0.05)，但SSYYJN组与KA组之间比较无统计学差异(*P*>0.05)。上述结果提示肾衰营养胶囊能增加TA p-mTOR蛋白的表达，其改善CRF骨骼肌萎缩的作用可能与上调骨骼肌p-mTOR蛋白的表达有关(图7)。

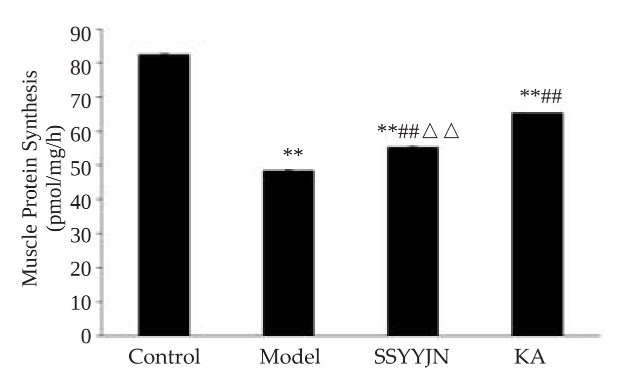


图3 同位素^{14}C-苯丙氨酸掺入法检测各组TA蛋白合成代谢变化

Fig.3 Muscle protein synthesis detected by incorporation of ^{14}C-phenylalanine experiment in different groups. $^{**}P<0.01$ *vs* Control group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* Model group; $^{\Delta\Delta}P<0.01$ *vs* KA group.

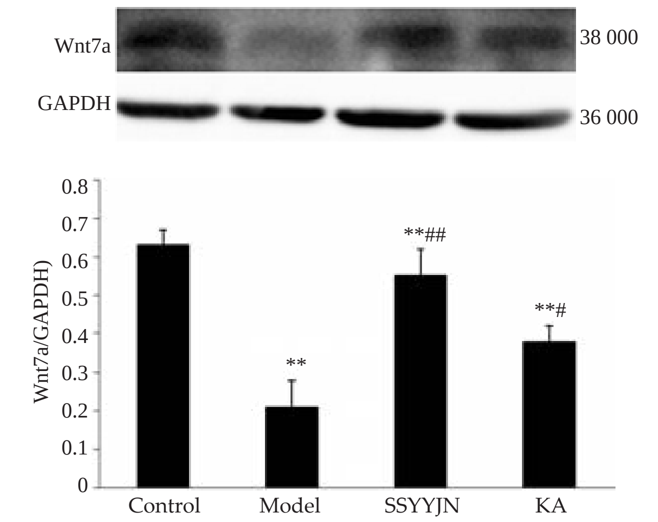


图4 Western Blot检测各组骨骼肌Wnt7a蛋白水平变化

Fig.4 Expression of Wnt7a protein detected by immunoblotting in different groups. $^{**}P<0.01$ *vs* Control group; $^{\#}P<0.01$, $^{\#\#}P<0.01$ *vs* Model group.

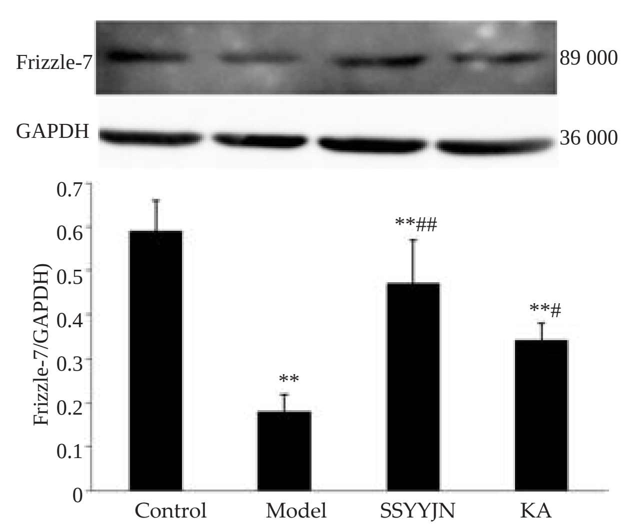


图5 Western Blot检测各组骨骼肌Frizzled-7蛋白水平变化

Fig.5 Expression of Frizzled-7 protein detected by immunoblotting in different groups. $^{**}P<0.01$ *vs* Control group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ *vs* Model group.

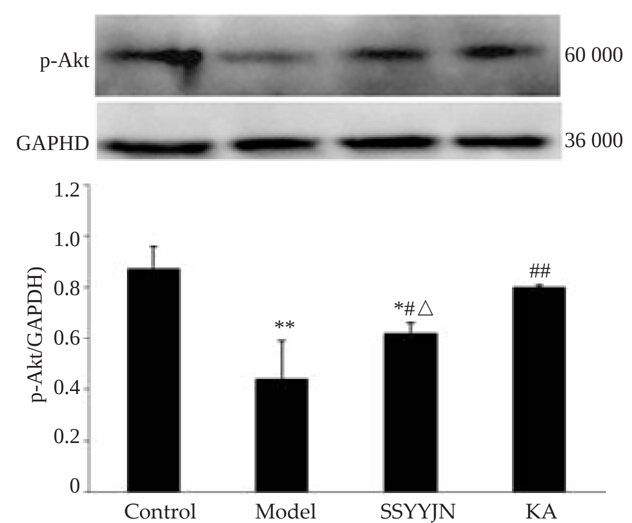


图6 Western Blot检测各组骨骼肌p-Akt蛋白水平变化

Fig.6 Expression of p-Akt protein detected by immunoblotting in different groups. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* Control group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ *vs* Model group; $^{\Delta}P<0.05$.

3 讨论

研究报道,超过半数的血液透析和腹膜透析患者由于肾功能衰竭出现营养不良[10],由此导致的肌萎缩是骨骼肌蛋白能量消耗的重要表现形式,也是预测CRF患者死亡的敏感指标之一。CRF病理损伤一旦形成很难逆转,早期治疗尤为重要。

肾衰营养胶囊(原肾衰养真胶囊/肾衰养真颗粒)是我课题组经多年临床观察,自拟治疗CRF营养不良的协定方药[11]。该药由党参、白术、茯苓、甘草、黄芪、当归、杜仲、大黄、砂仁组成,具有健脾补肾,益气养血之效,能显著改善CRF营养不良模型大鼠的肾功能及提高营养不良炎性反应评分[12]。本研究中观察到肾衰营养胶囊具有改善PEW导致的骨骼肌萎缩的效果,表现为大鼠TA湿重及干重增加,肌横截面积增大,骨骼肌蛋白质合成率升高,提示该药对CRF-PEW所致骨骼肌萎缩有一定的治疗作用,其效果优于阳性对照药物开同(复方α-酮酸片)。

Wnt7a-Akt/mTOR信号下调与骨骼肌活性下降及骨骼肌萎缩密切相关。Wnt信号是肌细胞终末分化的关键调控因子,能调控不同类型肌纤维[13]。骨骼肌细胞内Wnt7a通过结合其受体Frizzled,进而激活下游Akt/mTOR信号通路,促进肌管分化和肌纤维肥大[8]。在杜氏肌营养不良小鼠模型中观察到通过注射Wnt7a可诱导小鼠肌蛋白含量增加近2倍。本研究提取各组大鼠TA中的Wnt7a和Frizzled蛋白表达进行对比,发现CRF大鼠的TA的相关表达明显下降,肾衰营养胶囊和开同干预后,其蛋白表达增加,其中SSYYJN组结果最为显著。我们继而观测该信号通路的下游磷酸化Akt和mTOR的蛋白表达。Akt是调节肌肉蛋白合成代谢的重要因子,在磷酸化状态下具有激活下游底物mTOR蛋

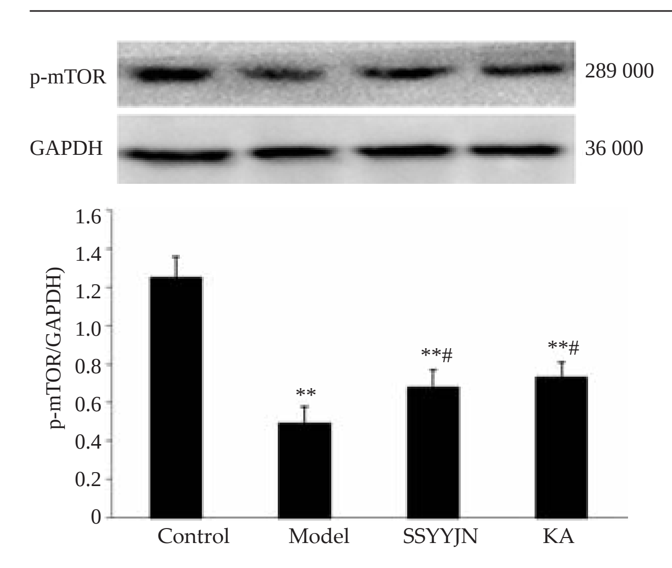


图7 Western Blot检测各组骨骼肌p-mTOR蛋白水平变化

Fig.7 Expression of p-mTOR protein detected by immunoblotting in different groups. $^{**}P$<0.01 *vs* Control group; $^{\#}P$<0.05 *vs* Model group.

白,进而调控骨骼肌的生长代谢[14-15]。本研究发现CRF大鼠的骨骼肌组织中磷酸化Akt和mTOR蛋白表达均有所下降,这与CRF状态下其上游蛋白Wnt7a和Frizzled的表达下降的相符,提示CRF大鼠骨骼肌肌肉萎缩与Wnt7a-Akt/mTOR信号通路活性减弱相关。采用肾衰营养胶囊和开同干预后,Akt/mTOR信号放大,而Wnt7a-Frizzled为药物启动靶点之一,提示肾衰营养胶囊和开同对CRF营养不良大鼠肌萎缩的改善作用与该信号通路的蛋白表达强弱相关。

本研究中肾衰营养胶囊对CRF大鼠肌萎缩的改善效果显著优于治疗CRF的经典西药开同。我们分析这可能与该复方药中多味中药具有激活该信号通路的作用相关。黄芪是肾衰营养胶囊的主要有效成分之一。我们前期研究发现其有效成分黄芪多糖在体外能够通过激活Akt/mTOR信号通路防止骨骼肌细胞凋亡[16]。藁本内酯是肾衰营养胶囊中当归的主要活性成分,也被证明其能抗骨骼肌凋亡,其机制与上调磷酸化Akt有关[17]。本研究在动物实验中证实了肾衰营养胶囊具有改善CRF大鼠的骨骼肌萎缩的功效,并与Wnt7a表达的升高,磷酸化Akt蛋白及mTOR蛋白水平的增多相关。综上,肾衰营养胶囊改善CRF营养不良状态的机制可能通过上调Wnt7a- AKT/mTOR信号通路完成,为CRF肌萎缩的治疗提供理论基础及实验依据。

参考文献:

[1] Bonanni A, Mannucci I, Verzola D, et al. Protein-Energy wasting and mortality in chronic kidney disease[J]. Int J Environ Res Public Health, 2011, 8(5): 1631-54.

[2] Jadeja YP, Kher V. Protein energy wasting in chronic kidney disease: An update with focus on nutritional interventions to improve outcomes[J]. Indian J Endocrinol Metab, 2012, 16(2): 246-51.

[3] Attaix D, Baracos VE, Pichard C. Muscle wasting: a crosstalk between protein synthesis and breakdown signalling[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012, 15(3): 209-10.

[4] Cao PR, Kim HJ, Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(10): 2088-97.

[5] Wang XH, Mitch WE. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(9): 504-16.

[6] Workeneh BT, Mitch WE. Review of muscle wasting associated with chronic kidney disease [J]. Am J Clin Nutr, 2010, 91(4): 1128S-32S.

[7] Cisternas P, Henriquez JP, Brandan EA. Wnt signaling in skeletal muscle dynamics: myogenesis, neuromuscular synapse and fibrosis [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(1): 574-89.

[8] von Maltzahn J, Zinoviev R, Chang NC, et al. A truncated Wnt7a retains full biological activity in skeletal muscle[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2869.

[9] Bentzinger CF, von Maltzahn J, Dumont NA, et al. Wnt7a stimulates myogenic stem cell motility and engraftment resulting in improved muscle strength[J]. J Cell Biol, 2014, 205(1): 97-111.

[10] 唐春苑, 叶晓青, 王饶萍. 维持性血液透析患者营养状况与睡眠关系研究[J]. 护理学报, 2013(13): 18-21.

[11] 魏连波, 张 颖, 汪南海. 肾衰养真颗粒治疗慢性肾脏病4、5期并发营养不良的临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(8): 696-9.

[12] 魏连波, 邓 聪, 陈杰彬, 等. 肾衰养真胶囊对5/6肾切除慢性肾衰营养不良大鼠营养状态的影响[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1391-5.

[13] Le Grand F, Jones AE, Seale V, et al. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(6): 535-47.

[14] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR[J].Genes Dev, 2001, 15(07): 807-26.

[15] Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, et al. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k[J]. EMBO J, 1997, 16(12): 3693-704.

[16] Lu L, Wang DT, Shi Y, et al. Astragalus polysaccharide improves muscle atrophy from dexamethasone- and peroxide-induced injury *in vitro*[J]. Int J Biol Macromol, 2013, 61(5): 7-16.

[17] Shi Y, Wang DT, Lu L, et al. Ligustilide prevents the apoptosis effects of tumour necrosis factor-alpha during C2C12 cell differentiation[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(2): 358-64.

(编辑:孙昌朋)